

## 《原著》

# <sup>111</sup>In 標識低比重リポ蛋白 (LDL) を用いた LDL 体内分布 および動脈硬化巣イメージングの検討

山科 久代\*

**要旨** <sup>111</sup>In にて標識した低比重リポ蛋白 (LDL) を、遺伝性高脂血症家兎である Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) ウサギおよびコントロールウサギに投与し、その体内動態を、 $\gamma$ -カメラによるイメージング、臓器放射能分布により検討した。体外イメージングではいずれのウサギも肝、心、腎、骨、脾が描出され、閑心領域を設定して肝／心比を算出したところ、WHHL 群にて有意に低値を認めた ( $p < 0.05$ )。LDL の血中半減期は同群で有意に長く、臓器放射能分布は血液、心、大動脈で明らかに高値であった。大動脈はオートラジオグラフィを施行し、WHHL 群にて大動脈弓、脇間・腹腔動脈分岐部の <sup>111</sup>In-DTPA-LDL の著明な集積を認めた。今後、標識 LDL により、リポ蛋白代謝および動脈硬化病変を表す体外イメージングが期待できる。

(核医学 30: 769-778, 1993)

## I. はじめに

初期動脈硬化巣では、動脈内皮細胞直下にコレステロールを多量に蓄積した泡沫細胞の集簇がみられる。このコレステロールは血清リポ蛋白により細胞内に搬入されたものであるが、ここに関与するリポ蛋白として、低比重リポ蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) が最も重要である。LDL 粒子中のコレステロールが動脈内皮細胞下に蓄積される機構について、1979 年、Brown と Goldstein<sup>1)</sup>が、LDL レセプターを介さない LDL の細胞内取り込み経路であるスカベンジャー経路の存在を見いだし、変性した LDL がこの経路にて特異的に取り込まれ、コレステロールの蓄積が生ずるという仮説を唱えた。その後 1989 年生体内に発生し得る変性 LDL として、酸化的に変性した LDL

が動脈硬化に関与するという仮説が Steinberg らにより示された<sup>2)</sup>。1990 年には児玉らによりスカベンジャー受容体の構造が明らかにされて<sup>3)</sup>、LDL の動脈硬化発生ならびに進展に関与する機序が次第に解明されつつある。

LDL が動脈硬化発症に関与する因子の一つであることは明らかであるが、動脈硬化性病変を、早期より診断するために、またリポ蛋白代謝異常が派生する病態を早期から把握するために、非侵襲的診断法の一つとして放射性核種にて標識した LDL を利用することが検討されてきた。標識に適する核種はそのエネルギーがガンマカメラの撮像にとって至適エネルギーを保有していること、撮像に適当な半減期を有すること、体内で代謝を受けにくいこと、標識により本来の LDL の性質を損なわないと必要と考えられる。<sup>123</sup>I-LDL<sup>5)</sup>, <sup>99m</sup>Tc-LDL<sup>6~11, 16)</sup>, <sup>123</sup>I-tyramine-cellobiose-LDL<sup>4, 10, 12, 13, 16)</sup>, <sup>111</sup>In-DTPA-LDL<sup>14, 15)</sup> 等、各種放射性核種を用いた LDL の標識が試みられ、おののの標識 LDL の性質の比較、実験動物およびヒトにおける生体内分布が報告されている。

そこで筆者は、遺伝性高脂血症モデル動物であ

\* 東邦大学医学部付属大森病院内科学第一講座

受付: 5 年 2 月 9 日

最終稿受付: 5 年 5 月 7 日

別刷請求先: 東京都大田区大森西 6-11-1 (番 143)

東邦大学医学部付属大森病院

内科学第一講座

山科 久代

る Watanabe hereditary hyperlipidemic (WHHL) ウサギを用い、リポ蛋白代謝と動物硬化性病変発現との関係を核医学的に究明するために、DTPA を介在し  $^{111}\text{In}$  によって標識した LDL を作製し、同標識 LDL を経静脈的に WHHL ウサギと正常ウサギに投与することにより、正脂血症および高脂血症における LDL の体内分布を比較し、大動脈硬化病変の描出を試みたのでここに報告する。

## II. 方 法

### 1) LDL の血清からの分離

本来 LDL は比重 1.019~1.063 g/ml に分画されるリポ蛋白粒子であるが、他のリポ蛋白の混入を避けるため、1.023~1.055 g/ml 分画の LDL を Havel の方法<sup>17)</sup>により、正常成人血漿より超遠心法にて分離した。すなわち採血後得られた血漿に KBr を添加し、全体の比重を 1.023 に調製、140,000×g, 4°C の条件下にて 24 時間後超遠心 (HITACHI 55P-72, 使用ローター RP55T) 後、下層を分取した。この下層分画に再度 KBr を添加し、全体の比重を 1.055 に調製、同じ条件下にて 24 時間超遠心した。上層の LDL 分画を、分取後さらに 1.055 比重液を加えて超遠心にて洗浄し、次に KBr を除去する目的で 0.001 M EDTA, 0.15 M NaCl, pH 7.4 にて 4°C, 48 時間にわたり透析した (Cellulose tubing, size 8/32, 三光純薬)。同 LDL 分画を脱脂後 (クロロホルム:メタノール=1:2), SDS ポリアクリラミドゲル (5~20% gradient gel) 電気泳動法にて泳動し、得られた LDL 分画はアポ B-100 のみを有する粒子であることを確認した。蛋白定量は、Lowry らの方法<sup>18)</sup>にて行った。

### 2) LDL の $^{111}\text{In}$ 標識

まず Hnatowich らの bicyclic anhydride 法<sup>19)</sup>をもとに、分取したヒト LDL に 0.4 M ホウ酸緩衝液、pH 8.6 を加え、cyclic anhydride of diethylene-triamineacetic acid (caDTPA) を結合させた。caDTPA は、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、LDL とは 1:20 のモル比で 30 分反応させた。その後高速液体クロマトグラフィ (HPLC,

1.5×60 cm, TSK-GEL G4000-SW, TOSO, Tokyo) にて DTPA-LDL を分取し、余剰の DTPA を除去した。DTPA-LDL は 0.2 μm のフィルター (ACRODISC 13, Gelman Sciences) を通した後、1.3~2.0 mg/ml に濃縮 (THK 24, MILLIPORE) し、0.1 M クエン酸緩衝溶液 (pH 5.7) を加え、 $^{111}\text{InCl}_3$  (日本メジフィジックス社) を反応させた。

標識体の分析として、標識約30分後にセルロースアセテート膜電気泳動法 (0.06 M バルビタール緩衝溶液、pH 8.6, 150 V 20分) にて泳動し、ポンソ 3R にてタンパク染色し、標識率を確認した。標識後、約 6, 24 時間後にも同様の電気泳動を施行し、標識体の安定性を確認した。

DTPA のカップリングレベル (LDL 1 分子に対する DTPA の結合数) は以下の方法にて決定した。作製した DTPA-LDL の一部と caDTPA の任意の量を 0.1 M クエン酸緩衝溶液 (pH 5.7) に添加し、 $^{111}\text{InCl}_3$  を加えて反応させた後、セルロースアセテート膜電気泳動を行った。DTPA-LDL と DTPA のそれぞれのモル数と  $^{111}\text{In}$  の標識率より、カップリングレベルを算出した。

### 3) $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL のウサギ体内分布

対象は日本白色家兎 (正常群, n=6, 体重 2.90~3.26 kg) と、Watanabe heritable hyperlipidemic ウサギ (WHHL 群, n=6, 体重 2.88~3.4 kg) である。これらの動物にネンブタール麻酔下において、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL (0.4 mCi/0.3~0.4 mg protein) を耳静脈より投与し、γ-カメラで正面から撮像した。0~60 分まではイメージデータ、カウントデータとともに 1 フレーム / 分にて dynamic image を、また 3, 24 時間後は 1 フレーム / 1500 k カウントにて static image を撮像した。使用機器は中エネルギー用高分解コリメータを GCA-90B digital camera (Toshiba, Tokyo) に装着し、エネルギー設定は 171 keV と 245 keV を中心に、ウィンドウ幅をおのおの  $\pm 10\%$  とした。コンピュータ解析 (medical image processor GMS-550U/SB, Toshiba, Tokyo) では、関心領域を全身、心、肝、腎、脾、尿 (膀胱)、糞に設け、その経時的变化を調べた。

また、<sup>111</sup>In-DTPA-LDL の投与直後、1, 3, 24 時間後に耳静脈より採血し、放射能をシングルチャンネルアナライザーにて測定し、その経時的変化を比較した。またこれらの値より<sup>111</sup>In-DTPA-LDL の血中半減期および異化率 (fractional catabolic rate, 以下 FCR) を算出<sup>20)</sup>し、比較検討した。

すべての撮像を終了後、ネンブタール麻酔下に頸動脈を露出、切開し、脱血した。死亡後解剖し、心、肺、肝、腎、副腎、脾、胃、小腸、大腸、大動脈、尿、糞について、シングルチャンネルアナライザーにて放射能を測定し、臓器当たりおよび臓器重量当たりの投与量に対する測定値の割合 (% injected radioactivity per organ: 以下 %IR, % injected radioactivity per gram of tissue: 以下 %IR/g) を算出した。

摘出した大動脈は縦切開し、ガラス板に広げ、イメージングプレート (Fuji Film, Tokyo) にオートラジオグラフィ法にて24時間撮像した。

### III. 結 果

#### 1. LDL の<sup>111</sup>In 標識

今回 LDL と DTPA の反応モル比を 1:20 として実験を行い、<sup>111</sup>In を標識後、セルロースアセテート膜を用いて電気泳動を行った (Fig. 1)。泳動膜上蛋白染色される部分に一致した<sup>111</sup>In-DTPA-LDL のピークを認め、標識率はほぼ 100% であった。標識約 6 時間後、24 時間後にも電気泳動を行ったが、約 85~100% の安定した標識率が得られた。また未標識 LDL との電気泳動を比較したところ、その移動度に差はみられなかった。

DTPA のカップリングレベルは LDL:DTPA = 1:8~13 であり、安定した値が得られた。

#### 2. <sup>111</sup>In-DTPA-LDL のウサギ投与実験

正常群には 12~16 週齢の比較的若齢のウサギを用いた。WHHL ウサギでは 5~10 月齢には全例大動脈に動脈硬化性病変が出現し、その約 60% に fatty streak、約 40% に内膜のび漫性肥厚と粥腫の所見を示すが<sup>21)</sup>、今回 WHHL 群として 9~11 月齢のものを用い、以下の結果を得た。

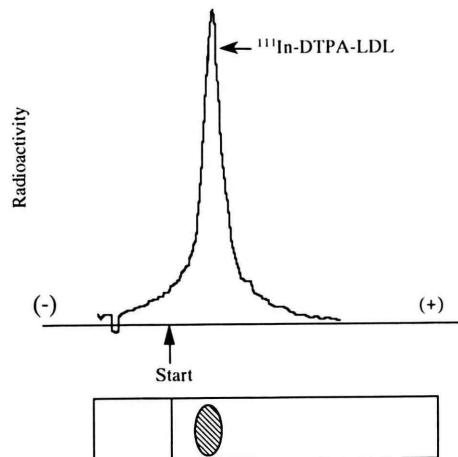


Fig. 1 Cellulose-acetate electrophoresis of <sup>111</sup>In-DTPA-LDL. <sup>111</sup>In-DTPA-LDL was stained with Ponso-3R protein stain (showing schema, bottom) and <sup>111</sup>In activity was counted (top).

#### 1) $\gamma$ -カメラによるイメージング

いずれのウサギも標識 LDL 投与直後より脳、心、肝、腎、骨が描出され、徐々に脾も映し出された。24 時間後には、尿 (膀胱) もわずかに描出された。Fig. 2 に正常例を呈示する。

正常群と WHHL 群を比較した場合、投与直後~1 時間および 3 時間後の像に明らかな差は認めず、24 時間後像では、WHHL 群にて心プールイメージがより明瞭であった。また、いずれのウサギでも副腎の像は得られなかった。

心イメージは、心臓内血液プールを表していると考えられるため、心臓および肝臓に関心領域を設けてピクセル当たりの平均カウント値を算出し、各時間での肝/心比を求ることにより、肝内に含まれる血液中の放射能による影響を除外し、肝臓内への LDL 取り込みの指標とした。Fig. 3 に示すごとく、24 時間後 WHHL 群は正常群に比し、有意に低値を示した。

#### 2) <sup>111</sup>In-DTPA-LDL の血中消失率

各時間における血中<sup>111</sup>In-DTPA-LDL の放射能をカウントし (counts/g)、投与直後の値を基準として、その経時的変化を表した (Fig. 4)。投与 3 時間後では正常群 0.69 に対し WHHL 群 0.83

( $p<0.05$ ), 24時間後では正常群 0.31 に対し WHHL 群 0.47 ( $p<0.01$ ) と, WHHL 群にて有意に高値を示した. データより算出した血中  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL の半減期は, 正常群  $13.8 \pm 1.61$  時間,

Table 1 Biodistribution of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL in rabbits

Organ	Percent of injected radioactivity per organ	
	Normal (n=6)	WHHL (n=6)
Blood	$34.4 \pm 2.06$	$54.5 \pm 3.02$
Liver	$7.79 \pm 0.49$	$7.75 \pm 0.73$
Kidney	$4.19 \pm 0.57$	$4.43 \pm 0.54$
Large bowel	$3.26 \pm 0.78$	$2.85 \pm 0.35$
Small bowel	$1.14 \pm 0.27$	$1.18 \pm 0.15$
Spleen	$1.27 \pm 0.56$	$0.56 \pm 0.13^*$
Stomach	$0.87 \pm 0.12$	$0.81 \pm 0.04$
Lung	$0.53 \pm 0.11$	$0.60 \pm 0.08$
Heart	$0.27 \pm 0.06$	$0.30 \pm 0.04$
Adrenal gland	$0.13 \pm 0.07$	$0.19 \pm 0.05$
Aorta	$0.05 \pm 0.04$	$0.11 \pm 0.03^{**}$
Urine	$4.97 \pm 1.87$	$4.93 \pm 1.16$
Stool	$0.42 \pm 0.30$	$0.30 \pm 0.10$

(mean  $\pm$  S.D.)

percent of injected radioactivity per organ

\* denotes significant difference between control and WHHL rabbit ( $p<0.05$ )

\*\* denotes significant difference between control and WHHL rabbit ( $p<0.01$ )

Table 2 Biodistribution of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL in rabbits

Organ	Percent of injected radioactivity per gram of tissue	
	Normal (n=6)	WHHL (n=6)
Spleen	$0.83 \pm 0.453$	$0.58 \pm 0.143$
Adrenal gland	$0.69 \pm 0.522$	$0.61 \pm 0.091$
Kidney	$0.27 \pm 0.044$	$0.27 \pm 0.052$
Blood	$0.16 \pm 0.012$	$0.25 \pm 0.010^*$
Liver	$0.09 \pm 0.031$	$0.09 \pm 0.009$
Lung	$0.06 \pm 0.012$	$0.08 \pm 0.013$
Heart	$0.04 \pm 0.008$	$0.05 \pm 0.005^{**}$
Aorta	$0.03 \pm 0.020$	$0.07 \pm 0.024^*$
Large bowel	$0.08 \pm 0.023$	$0.02 \pm 0.002$
Small bowel	$0.02 \pm 0.004$	$0.02 \pm 0.003$
Stomach	$0.007 \pm 0.001$	$0.01 \pm 0.002^{**}$

(mean  $\pm$  S.D.)

percent of injected radioactivity per gram of tissue

\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$

WHHL 群  $21.8 \pm 4.35$  時間 (以後平均  $\pm$  標準偏差) と有意に WHHL 群で長く ( $p<0.01$ ), FCR は正常群  $0.05 \pm 0.006 \text{ hr}^{-1}$ , WHHL 群  $0.03 \pm 0.007 \text{ hr}^{-1}$  と, 後者でやはり有意に低値を示した ( $p<0.01$ ).

### 3) $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL の臓器分布

いずれのウサギも  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL 投与後 24 時間に, 麻酔下にて頸動脈より  $60 \sim 100 \text{ ml}$  の脱血を行い死亡させた. %IR および %IR/g は, それぞれ Tables 1, 2 に示すとおりである. %IR は肝, 脾, 肺 (正常群でそれぞれ  $7.79 \pm 0.49$ ,  $4.19 \pm 0.57$ ,  $3.26 \pm 0.78$ %, WHHL 群でそれぞれ  $7.75 \pm 0.73$ ,  $4.43 \pm 0.54$ ,  $2.85 \pm 0.35$ %) その他表に示す順に多く, %IR/g にて示すと脾, 副脾, 脾, 血液 (正常群でそれぞれ  $0.83 \pm 0.45$ ,  $0.69 \pm 0.52$ ,  $0.27 \pm 0.04$ ,  $0.16 \pm 0.01$ , WHHL 群でそれぞれ  $0.58 \pm 0.14$ ,  $0.61 \pm 0.09$ ,  $0.27 \pm 0.05$ ,  $0.25 \pm 0.01$ ) に分布が多くみられ, 大動脈 ( $p<0.05$ ), 血液 ( $p<0.05$ ), 心 ( $p<0.01$ ) では, 正常群よりも WHHL 群にて有意に高値を認めた. 脾に関しては, 重量当たりでは値に変動が大きく, 有意差が得られなかつたが, 正常群に高い傾向を示した.

### 4) 動脈硬化巣イメージング

摘出したいずれの大動脈に関してもオートラジオグラフィを施行したところ, WHHL 群の大動脈弓部, 肋間動脈分岐部, 腹腔・腎動脈分岐部に局在した  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL の著明な集積を認めた. 正常群にては同様の集積はみられなかった (Fig. 5). 集積が見られる部位は, 肉眼的にも動脈硬化巣と確認できる変化を示していたが, 組織学的にも内膜の肥厚と内膜, 中膜への泡沫細胞の出現および脂質の沈着を認めた (Fig. 6). シュルツ法によるコレステロール染色にて同部位でコレステロールが青緑色に染色され (Fig. 7), oil-red O 染色にても脂質や泡沫細胞が赤色に染色されるのを確認した (Fig. 8).

## IV. 考 察

血中 LDL の代謝は, 約 2/3 が LDL レセプターを介する経路により異化されるが, 残りの約 1/3

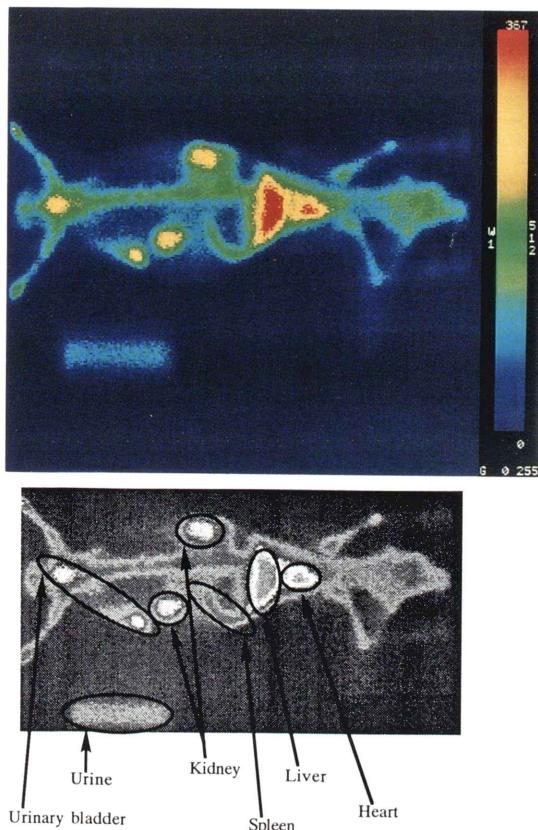


Fig. 2 Scintigraphic image by  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL in normal rabbit at 24 hours after injection. The image shows intensity uptake by brain, liver, spleen, kidney and pool image in heart and urinary bladder.

はスカベンジャー受容体に取り込まれ、血中から消失する。この際スカベンジャー受容体に結合する LDL は修飾変性を受けた LDL である。血中で変性 LDL は肝細胞にて異化され、血中からは速やかに消失することが Steinbrecher らにより示されている<sup>22)</sup>。血液中の LDL は、動脈壁の内皮細胞下に侵入した後、そこに存在する各細胞との反応で変性を受け、酸化 LDL や MDA (malondialdehyde)-LDL に変化する。こうした変性 LDL は、マクロファージを中心とした壁在細胞の細胞膜に存在するスカベンジャー受容体

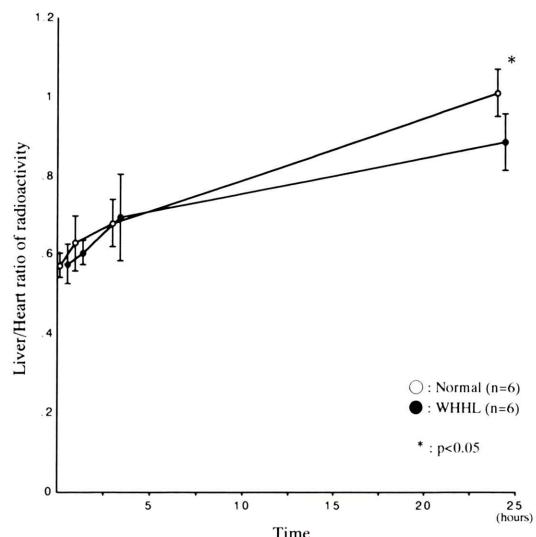


Fig. 3 Time course of Liver/Heart ratios determined by scintigraphic imaging in normal and WHHL rabbits. These data represent the mean  $\pm$  1 s.d. of the ratios of background-subtracted counts per pixel in liver and heart.

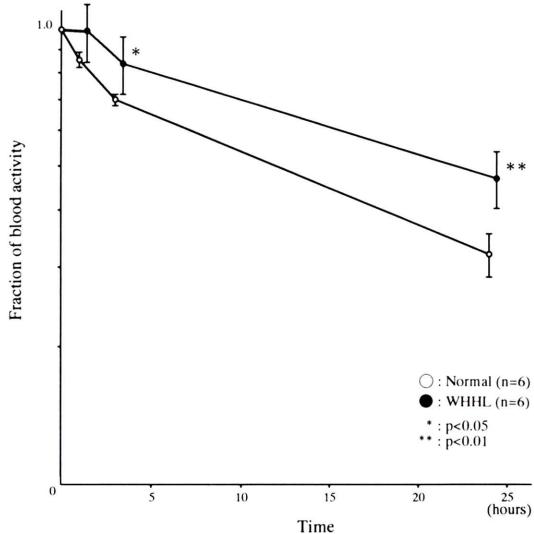


Fig. 4 Plasma disappearance changes of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL in rabbits. The plasma disappearance of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL was slower in WHHL rabbits than in normal rabbits.

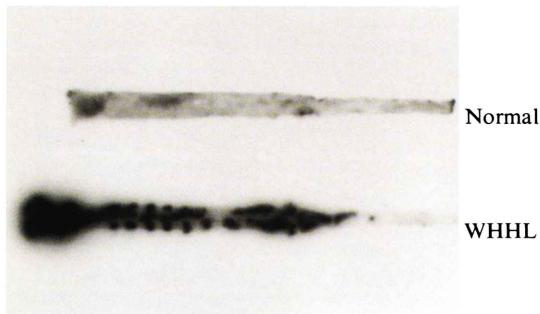


Fig. 5 Autoradiographic image shows  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL accumulation in aortic arch, bifurcation of intercostal, celiac and renal arteries of WHHL rabbit aorta.

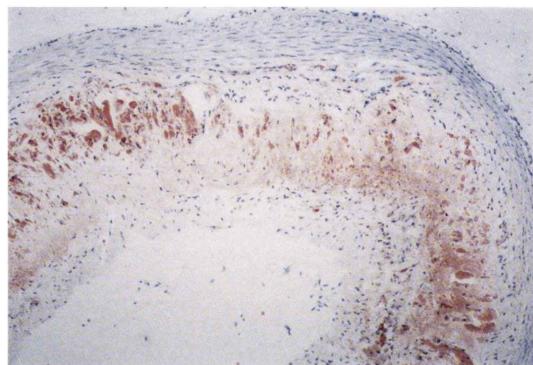


Fig. 8 Oil-red O stain shows foam cells and lipid deposits in the aorta of WHHL rabbit.

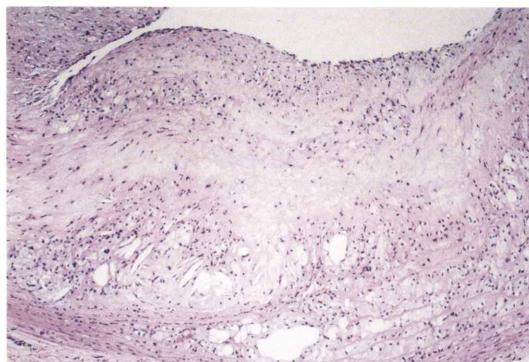


Fig. 6 Hematoxylin-eosine (HE) stain shows intimal thickness and accumulation of foam cells in the intima and media of WHHL rabbits.

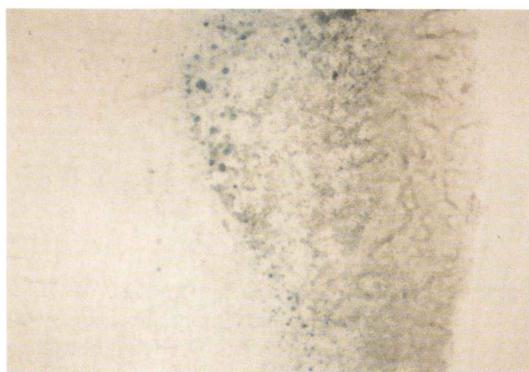


Fig. 7 Cholesterol is demonstrated in the intima and media by cholesterol stain (Schultz method).

に取り込まれる。スカベンジャー受容体は通常の LDL 受容体と異なり、細胞内コレステロール濃度によってその受容体活性は down regulation を受けないため、マクロファージは変性 LDL を限界なく取り込んで泡沫細胞に変化する。今回用いた  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL がいかなる体内動態を示したか、標識 LDL の性質をふまえて検討した。

#### 1. $^{111}\text{In}$ による標識について

以前より LDL の標識は、 $^{125}\text{I}$  に始まり種々試みられている。放射性ヨードの結合は体内で脱ヨード化を受け易く、また  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の場合はその半減期が短いため、比較的代謝時間が長いリボ蛋白をみるとには標識物質として必ずしも適当とはいえない。今回筆者は、比較的高いエネルギー (171 keV, 245 keV) と長い放射能半減期 (2.8 日) を有する  $^{111}\text{In}$  を用いた。また DTPA のカップリングにより、より高い標識率や体内の安定性を得ることを期待した。DTPA の反応数が少ないと想定したため、LDL と DTPA の反応モル比は基礎実験の段階で、1: 10, 1: 20, 1: 40, 1: 80 のそれぞれについてセルロースアセテート膜電気泳動を行い、標識率を検討した。標識に際し、 $^{111}\text{In}$ -ヨードや  $^{111}\text{In}$ -DTPA が出現して標識率が低下する可能性があったが、1: 20 の反応条件下では、

蛋白染色にて染まる LDL 部分に一致した放射能のピークがみられ、他の標識物質は混在しなかった (Fig. 1). 1: 10 では陰極寄りに、1: 40 および 1: 80 では陽極寄りに標識 LDL 以外の放射能の増加を認めたため、反応モル比は安定した標識の得られる 1: 20 とした。

## 2. $\gamma$ -カメラによる体外イメージングについて

体外からの <sup>111</sup>In-DTPA-LDL のイメージングは、投与後短時間のうちに血中に存在する LDL を反映し、脳、肝、腎といった血流の豊富な実質臓器が描出され易い。そこで心臓と、血流および LDL レセプターの豊富な肝臓について閑心領域を設定し、肝/心比を算出したところ、投与後 24 時間で両群間に有意差が得られた。これは肝内に存在する血液中の放射能による因子を除外し、肝自体への取り込みを反映した結果であると考えられた。よって、今後はさらに長時間にわたり経過を観察することで、LDL の細胞内異化を中心とした体内動態を明らかにすることが期待できる。また経時的に脾・骨も徐々に描出され、網内系への標識 LDL の取り込みが示唆された。今回検討したモデル動物では正常群においても副腎の描出が得られなかつたが、これは後述するように標識条件による LDL の性質の変化と、臓器が小さいために  $\gamma$ -カメラにて描出されにくくことが関係していると考えられる。

## 3. <sup>111</sup>In-DTPA-LDL の体内分布について

血中 <sup>111</sup>In-DTPA-LDL のカウント値は 24 時間後 WHHL 群にて有意に高く、その経時的変化から算出した半減期、および FCR の値より、両群間に明らかな代謝動態の差異が示された (Fig. 5). WHHL ウサギでは LDL レセプターの活性が遺伝的に非常に低下しているため、一般的に LDL レセプターが豊富に存在する肝・副腎においては、正常群に比し取り込みが少ないと予想されたが、今回の検討ではその差は顕著でなかった (Tables 1, 2). その理由として、比較的半減期が長く、高エネルギーの核種を用いていること、尿、糞中に排泄される放射能の割合がわずかであることも含め、投与 1 日後の値は血中にかなり含まれる

<sup>111</sup>In-DTPA-LDL の放射能の影響が大きいと考えられる。解剖時に脱血を行っているが、まだ多量の血液が残存しており、血流豊富な臓器はその影響を受けているであろう。解剖後、血液除去が容易であった心、大動脈、胃において、有意に WHHL ウサギにて LDL の放射能が有意に高値を示したことは興味深い。しかし一方、標識により LDL レセプター結合部位が変化し、臓器への LDL 結合ならびに取り込みが阻害された可能性もあり、この点は肝細胞、副腎細胞と *in vitro* の系にて binding assay を施行することで確認すべく準備をしている。電気泳動上未標識 LDL と標識 LDL の移動度は同一であったが、LDL 側のレセプター結合部位にあるリジン残基に標識物質が結合した場合、電荷の変化なくレセプターとの結合を阻害し得る<sup>23)</sup>。今回のカップリングレベルは LDL: DTPA = 1: 8~13 であり、この結合にて native LDL が何らかの変性 LDL としての性質をあわせ持つことが考えられる。網内系への取り込みが多いことからもスカベンジャー経路への関与が考えられ、LDL の性質の変化も示唆される。Rosen ら<sup>14)</sup>は、<sup>111</sup>In-DTPA-LDL の fibroblast binding study およびウサギの体内分布を検討した。ここで <sup>111</sup>In-DTPA-LDL は *in vitro* では LDL レセプターへの親和性が低く、非飽和性で、修飾 LDL の性質の付加が示唆されたが、*in vivo* ではむしろ臓器 LDL レセプターの活性を反映しているという native LDL と変性 LDL の両者の性質を証明する結果が示されている。一方 Virgolini ら<sup>23)</sup>は、肝原形質膜での <sup>123</sup>I-LDL、<sup>111</sup>In-DTPA-LDL、未標識 LDL の相互作用を比較した実験を行っているが、<sup>111</sup>In 標識リポ蛋白が、リポ蛋白レセプターへの結合にはより良いリガンドであると結論づけている。この 2 つの実験と今回筆者の行った実験は、いずれも LDL と DTPA の反応モル数が異なり、反応条件の違いにより標識 LDL の性質も変化し、細胞レベルでの取り込みの相違を生じていると推測される。

## 4. 動脈硬化巣イメージング

今回の大動脈オートラジオグラフィでは、

WHHL の動脈硬化巣部位に明らかに集積の増加がみられ、核医学的に動脈硬化巣の形態描出が可能であることを証明した。体外イメージングでは動脈硬化像の描出は得られなかつたがその原因是、主に target 対 non-target, すなわち大動脈硬化部と周辺の他臓器の放射能比が低いためと考えられる (WHHL 群での Aorta/Blood (%IR/g) 0.28, Aorta/Liver 0.78)。Lees ら<sup>8)</sup> や Rosen ら<sup>14)</sup> の指摘のように、LDL の血中からの代謝時間が長いため、より半減期の長い放射性核種を用いることは有利な条件であるが、今回の標識 LDL の血中半減期から推察すると、<sup>111</sup>In を用いてもなお体外イメージングは困難と考えられた。また心、肝、骨のイメージングと重複すること、小動物の場合は硬化巣自体がきわめて小さいこともイメージングの際は考慮すべきと思われる。

今回の標識 LDL は、体外排泄も少なく、体内で安定性も良好であった。今後は LDL レセプター、スカベンジャー・レセプターその他動脈硬化部に、より親和性を有する標識物質または標識条件の検討、データの収集方法、イメージの解像力の向上等を検討することによって、将来リポ蛋白代謝動態および動脈硬化病変の把握可能な体外イメージングが期待できると考えられる。

## V. まとめ

- 1) <sup>111</sup>In 標識 LDL を作製し、正脂血症および遺伝性高脂血症ウサギに投与、LDL 体内分布の検討ならびに動脈硬化病変の描出を試みた。
- 2) ガンマカメラにより生体内の LDL 代謝を非侵襲的に、経時的にイメージングすることが可能であった。
- 3) 標識 LDL の血中半減期、FCR、臓器放射能測定より、高脂血症群と正常群の LDL 代謝に差異が認められた。
- 4) オートラジオグラフィにより、核医学的に動脈硬化巣への LDL の集積を証明し得た。
- 5) 標識 LDL は、リポ蛋白代謝異常および動脈硬化病変の検出を可能にするトレーサーの一つとして有用性が高いことが判明した。

謝辞：稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました東邦大学内科学第一講座、森下健教授に深謝いたします。また本研究を行うにあたり、直接のご指導とご教授をいただきました東京慈恵会医科大学青戸病院内科多田紀夫助教授、東邦大学内科学第一講座 河村康明博士、さらに病理組織学的な助言をいただきました東邦大学病院病理学講座 三浦妙太教授、多大なご協力をいたしました日本メジフィジックス株式会社中央研究所白神宜史氏、森下健一氏に、心より御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Brown MS, Goldstein JL, Krieger M, Ho YK, Anderson RGW: Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biology* **82**: 597-613, 1979
- 2) Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* **320**: 915, 1989
- 3) Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matudaira P, Krieger M: Type I macrophage scavenger receptor contains  $\alpha$ -helical and collagen-like coiled coils. *Nature* **343**: 531-535, 1990
- 4) Lees RS, Lees AM, Strauss HW: External imaging of human atherosclerosis. *J Nucl Med* **24**: 154-156, 1983
- 5) Sinzinger H, Bergmann H, Kaliman J, Angelberger P: Imaging of human atherosclerotic lesions using <sup>123</sup>I-low-density lipoprotein. *Eur J Nucl Med* **12**: 291-292, 1986
- 6) Lees RS, Garabedian HD, Lees AM, Schumacher DJ, Miller A, Strauss W, et al: Technetium-99m low density lipoproteins: preparation and biodistribution. *J Nucl Med* **26**: 1056-1062, 1985
- 7) Fischman AJ, Lees AM, Lees RS, Barlai-Kovach M, Strauss W: Accumulation of native and methylated low density lipoprotein by healing rabbit arterial wall. *Arteriosclerosis* **7**: 361-366, 1987
- 8) Lees AM, Lees RS, Schoen FJ, Isaacson JL, Fischman AJ, Strauss W, et al: Imaging human atherosclerosis with <sup>99m</sup>Tc-labeled low density lipoproteins. *Arteriosclerosis* **8**: 461-470, 1988
- 9) Vallabhajosula S, Paidi M, Badimon JJ, Le NA, Goldsmith SJ, Ginsberg HN, et al: Radiotracers for low density lipoprotein biodistribution studies in vivo: technetium-99m low density lipoprotein versus radioiodinated low density lipoprotein preparations. *J Nucl Med* **29**: 1237-1245, 1988
- 10) Vallabhajosula S, Goldstein S: <sup>99m</sup>Tc-low density lipoprotein: intracellularly trapped radiotracer for

- noninvasive imaging of low density lipoprotein metabolism in vivo. *Semin Nucl Med* **1**: 68-79, 1990
- 11) Lees RS, Lees AM, Fischman AJ, Fischman AJ, Strauss HW: External imaging of active atherosclerosis with <sup>99m</sup>Tc-LDL. In Glagov S, Newman WP III, Schaffer SA, eds. *Pathology of the human atherosclerotic plaque*. New York, Springer-Verlag, 1990, pp. 841-851
- 12) Portman OW, Alexander M: Metabolism of <sup>125</sup>I-tyramine cellobiose-labelled low density lipoproteins in squirrel monkeys. *Atherosclerosis* **56**: 283-299, 1985
- 13) Moerlein SM, Dalal KB, Ebbe SN, Yano Y, Budinger TF: Residualizing and non-residualizing analogues of low-density lipoprotein as iodine-123 radiopharmaceuticals for imaging LDL catabolism. *Nucl Med Biol* **15**: 141-149, 1988
- 14) Rosen JM, Butler SP, Meinken GE, Wang TST, Remarkrishman R, Ginsberg HN, et al: Indium-111-labeled LDL: a potential agent for imaging atherosclerotic disease and lipoprotein biodistribution. *J Nucl Med* **31**: 343-350, 1990
- 15) Moerlein SM, Daugherty A, Sobel BE, Welch MJ: Metabolic imaging with gallium-68- and indium-111-labeled low-density lipoprotein. *J Nucl Med* **32**: 300-307, 1991
- 16) Hay RV, Fleming RM, Ryan JW, Williams KA, Stark VJ, Harper PV, et al: Nuclear imaging analysis of human low density lipoprotein biodistribution in rabbits and monkeys. *J Nucl Med* **32**: 1239-1245, 1991
- 17) Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**: 1345-1353, 1955
- 18) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951
- 19) Hnatowich DJ, Childs RL, Lateigne D, Najafi A: The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metabolic radionuclides: an improved method. *J Immun Method* **65**: 147-157, 1983
- 20) Matthews CME: The theory of tracer experiments with <sup>131</sup>I-labelled plasma proteins. *Phys Med Biol* **2**: 36-53, 1957
- 21) 渡辺嘉雄: LDL receptor 欠損の遺伝性高脂血症・動脈硬化症ウサギ (WHHL-Rabbit). *TOKYO TANABE QUARTERLY* **32**: 42-48, 1981
- 22) Steinbrecher UP, Witztum JL, Parathasarathy S, Steinberg D: Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL: Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* **7**: 135-143, 1987
- 23) Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW: Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem* **253**: 9053-9062, 1978
- 24) Virgoni I, Angelberger P, Li SR, Koller E, Pidlich J, Sinzinger H, et al: Indium-111-labeled low density lipoprotein binds with higher affinity to the human liver as compared to iodine-123-low-density-labeled lipoprotein. *J Nucl Med* **32**: 2132-2138, 1991

## Summary

### **Evaluation of Biodistribution and Imaging of Atherosclerotic Lesions Using $^{111}\text{In}$ -Labeled Low-Density Lipoprotein**

Hisayo YAMASHINA

*First Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine, Tokyo*

$^{111}\text{In}$ -labeled low-density lipoprotein (LDL) was administered to Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits (WHHL group) and control rabbits (control group) to evaluate its biodistribution and scintigraphic images by  $\gamma$ -camera and radioactivity of each organ. With external imaging, the heart, liver, kidney, bone and spleen of each rabbit were observed. By setting the region of interest, the liver/heart ratio of the WHHL group was significantly lower than that of the control group ( $p < 0.05$ ), the plasma half life of LDL was longer and radioactivity in blood, heart and aorta was higher

in the WHHL group. Each aorta was autoradiographed and significant accumulation of  $^{111}\text{In}$ -labeled-LDL was recognized in the aortic arch, bifurcation of intercostal and celiac artery in the WHHL group. By the use of labeled LDL with the combination of  $\gamma$ -camera, it is capable of detecting the regulation of lipoprotein metabolism and imaging atherosclerotic lesions externally.

**Key words:**  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LDL, Atherosclerosis, Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) rabbit.